



# **DIASTAATTISEN VOIMAN JA ALFA- AMINOTYPEN AUTOMATISOITUJEN MITTAUSMENETELMIEN VALIDOINTI**

Terhi Virolainen

Opinnäytetyö  
Helmikuu 2013  
Laboratorioalan  
koulutusohjelma

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma

TERHI VIROLAINEN:

Diastaattisen voiman ja alfa-aminotypen automatisoitujen mittausmenetelmien validointi

Opinnäytetyö 42 sivua, joista liitteitä 9 sivua  
Helmikuu 2013

---

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida kaksi mallasteollisuuden tärkeää analyysimenetelmää. Menetelmillä mitattiin diastaattisen voiman ja alfa-aminotypen määrää ohra- ja mallasnäytteistä. Kyseessä on tuotannon omavalvontalaboratorio, joten tulosten luotettavuus ja toistettavuus ovat hyvin tärkeitä. Näin ollen myös validointi oli tarpeen. Validointi parantaa tulosten tarkkuutta ja luotettavuutta huomattavasti ja menetelmien suorittaminen automatisoidulla laitteella vähentää inhimillisten virheiden mahdollisuutta.

Validointi toteutettiin SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattorilla, jolle automatisoidut menetelmät oli suunniteltu. Validoinnin suorittamiseen käytettiin mallasteollisuuden kaupanäytteitä sekä standardiliuoksia. Työtä varten tehtiin validointisuunnitelma, joka määritteli validoinnin laajuuden. Työssä määritettiin molemmille menetelmille lineaarisuus ja regressio, systeemin toistettavuus, tarkkuus, menetelmän toistettavuus sekä toteamis- ja määrittelyrajat.

Kaikkien parametrien tulokset molemmille menetelmille olivat hyväksyttävissä rajoissa, joten validointi onnistui. Laboratorio käyttää validoituja automatisoituja menetelmiä jokapäiväisissä analyyseissään ja on saanut todella hyviä tuloksia myös kansainvälisissä vertailuanalyyseissä. Työtä suoritettaessa laboratoriolle ei ollut omaa, virallista validointiohjetta, vaan ohje sovellettiin SKALAR:n menetelmäohjeista ja yleisistä validointiohjeista. Kaikkia laitteita ja menetelmiä ei ole tarkoituksenmukaista validoida yhtä laajasti, mutta yhteneväisyys ja virallisuus ovat validoinnissa tärkeitä. Laboratoriolle ollaankin nyt laatimassa omaa, virallista ohjetta, jota voidaan tulevaisuudessa soveltaa kaikille laitteille ja menetelmille.

---

Asiasanat: validointi, mallasteollisuus, diastaattinen voima, alfa-aminotyyppi

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Science

TERHI VIROLAINEN:

Validation of Automated Measuring Methods for Diastatic Power and Alfa-Amino Nitrogen

Bachelor's thesis 42 pages, appendices 9 pages  
February 2013

---

The goal of this Bachelor's thesis was to validate two important analytic methods in the field of malting industry. These methods were used to measure the amount of diastatic power and alfa-amino nitrogen in barley and malt samples. Validation was needed since the laboratory monitors the quality of production. Validation improves the accuracy and reliability of the results. The automatization of these methods also decreases the possibility of human errors.

The validation was performed with a SAN<sup>++</sup> Continuous Flow –analyzer, to which the automated methods were designed for. Commercial malting samples and standard solutions were used to validate these methods. A validation plan was manufactured to define the extent of the validation. The work was carried out by determining the following parameters for both methods: linearity and regression, system repeatability, accuracy, method repeatability and the limits of detection and quantification.

The results for all parameters in both methods were acceptable. Validation of automated methods for diastatic power and alfa-amino nitrogen was successful. The laboratory uses these methods in everyday analyses and has got good results in international reference analyses. At the time the laboratory did not have an own official validation directive. The directive used in this validation was revised from public validation reports and the SKALAR Methods - manual. All equipment and methods need not to be validated as extensively, but uniformity and formality are important when it comes to official validation. The laboratory is now compiling their own official validation directive which can be adapted to all equipment and methods in the future.

---

Key words: validation, malting industry, diastatic power, alfa-amino nitrogen

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	TAUSTAA .....	7
2.1	Oluen historiaa.....	7
2.2	Mallastus ja mäskäys .....	8
2.3	Entsyymitoiminta.....	10
2.4	Pilsnermallas ja entsyymimallas .....	12
2.5	Oluiden lajittelu .....	13
3	AUTOMATISOITU VESIKEMIAN ANALYSAATTORI .....	14
3.1	SAN <sup>++</sup> Continuous Flow -analysaattorin toimintaperiaate .....	15
3.2	Käyttö mallasteollisuudessa.....	17
4	VALIDOINTI.....	19
4.1	Tarkoitus ja hyödyt .....	19
4.2	Validointiparametrit.....	20
5	MENETELMIEN VALIDOINTI.....	22
5.1	Validointisuunnitelma.....	22
5.2	Työn suoritus .....	22
5.3	Työn tulokset .....	26
6	POHDINTA.....	32
	LÄHTEET.....	33
	LIITTEET .....	34
	Liite 1. Liuosohjeet.....	34
	Liite 2. Lineaarisuus .....	35
	Liite 3. Lineaarinen regressio .....	36
	Liite 4. Systeemin toistettavuus.....	38
	Liite 5. Tarkkuus .....	39
	Liite 6. Menetelmän toistettavuus .....	40
	Liite 7. Toteamis- ja määrittäysrajat.....	41

## 1 JOHDANTO

Opinnäytetyön kokeellinen osa suoritettiin Viking Malt Oy:n laboratoriossa Lahdessa kesällä 2012. Viking Malt Oy on Pohjoismaiden suurin maltaan tuottaja ja yrityksellä on tuotantolaitoksia Lahden lisäksi myös Ruotsin Halmstadissa ja Liettuan Panevezysissa. Viking Malt Oy kuuluu suomalaiseen Polttimo-konserniin, mutta sillä on myös toinen omistaja, ruotsalainen Lantsmännens Group. Jokaisessa tuotantolaitoksessa on oma laadunvalvontalaboratorio, mutta Lahden laboratoriossa suoritettavien analyysien määrä ja monipuolisuus on suurin. Laadunvalvonnan lisäksi laboratoriossa tehdään jonkin verran myös tuotekehitystä, mutta se kuuluu suurimmaksi osaksi sisaryhtiö Senson Oy:n toimintaan.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida kaksi mallasteollisuuden tärkeää analyysimenetelmää eli diastaattisen voiman ja alfa-aminotyypen mittaamenetelmät. Validointi varmistaa menetelmien soveltumisen laitteelle, jossa niitä käytetään, sekä niiden luotettavan toiminnan. Koska laboratorio vastaa täysin tuotannon laadunvalvonnasta, on menetelmien tärkeää olla luotettavia ja toimivia. Tästä voidaan varmistua validoinnilla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa näiden kahden tärkeän menetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta validoimalla tärkeimmät parametrit. Menetelmät ovat jokapäiväisessä käytössä ja käyttäjiä on useita, joten validointi oli tarpeen. Menetelmien automatisointi parantaa tulosten tarkkuutta ja luotettavuutta huomattavasti ja validointi varmistaa sen. Myös inhimilliset virheet ja eri tekijöistä johtuvat tulosten virhemarginaalit pienenevät tai jopa häviävät kokonaan, kun analyysit suoritetaan laitteella. Ajo-olosuhteet pysyvät muuttumattomina ja liuosten sekoitussuhde ja analyysiaika ovat aina täysin samat.

Analyysit oli ennen suoritettu manuaalisilla, validoiduilla menetelmillä, mutta laboratorioon hankittiin keväällä 2012 laite, jolla menetelmät on mahdollista suorittaa automatisoidusti. Kyseessä on SAN<sup>++</sup> Continuous Flow –analyysaattori, jonka toiminta perustuu segmentoituun virtaukseen. Laitteen kemialliseen yksikköön on mahdollista liittää useita eri moduuleja, joista jokainen voi suorittaa yhtä analyysiä kerrallaan. Laitteella, jossa on yksi kemiallinen yksikkö, on täten mahdollista suorittaa jopa neljä analyysiä samanaikaisesti.

Validointi suoritettiin pitkällä aikavälillä päivittäisten analyysien yhteydessä. Molemmille menetelmille määritettiin lineaarisuus ja regressio, systeemin toistettavuus, tarkkuus, menetelmän toistettavuus sekä toteamis- ja määrittäysrajat. Validoinnissa käytettiin hyväksi analysoitaviksi tulleita ohra- ja mallasnäytteitä sekä laitteenvalmistajan menetelmille suunnittelemaa standardiliuoksia. Kaikki parametrit määritettiin samoissa ajo-olosuhteissa, samoja ajoliuoksia käyttäen.

## 2 TAUSTAA

### 2.1 Oluen historiaa

Vaikka olutta pidetään eurooppalaisena juomana, sen juuret ovat nykyisen Irakin alueella. Sieltä on löydetty todisteita oluen olemassa olosta jo 3000 vuotta ennen ajanlaskumme alkua. Ohra oli ensimmäisiä ihmisen viljelemiä viljoja ja siitä valmistettuja leipiä säilytettiin usein ruukuissa. Leivät muhivat vesiruukuissa, joista ne juotiin puuromaisena nesteenä. Ohra on arvatenkin alkanut käydä ruukuissa lämmön vaikutuksesta ja näin keksittiin vahingossa olut. (Salmi 2003, 5.)

Entisen Kaksoisvirranmaan alueella (nykyinen Irak) osattiin tehdä jopa 16 erilaista olutta. Siihen aikaan olut oli samanarvoista rahan kanssa ja sillä maksettiin palkkoja ja verojakin. Vuosien kuluessa olutlajit lisääntyivät ja tavat muuttuivat, mutta oluen asema taivaan lahjana ja elämän juomana säilyi. (Salmi 2003, 5-6.)

Alkuaikoina naisilla oli merkittävä rooli oluen panemisessa, mutta kun siitä pikkuhiljaa tuli liiketoimintaa, miehet ottivat ohjaket käsiin. Panimoteollisuuden historia on keskiajan luostareissa, joissa munkeilla oli aikaa ja ymmärrystä perehtyä oluen panemiseen. Maallikkopanimot yleistyivät vasta 1000-luvulla, jolloin niistä myös tuli osa valtioiden vaurauden ylläpitäjiä. Kaupunkilaistumisen myötä pienpanimot yleistyivät etenkin Euroopassa ja ensimmäinen panimomestareiden ammattikunta syntyi vuonna 1303 Bruggessä. Keskiajan loppupuolella panimot olivat jo niin yleisiä, että valtiot kehittivät niitä koskevia säädöksiä, veroja ja jopa lakeja (mm. saksalainen puhtauslaki). Näihin aikoihin panimoteollisuus rantautui myös Suomeen. (Salmi 2003, 7-8 ja 11.)

Panimoiden toiminta tehostui merkittävästi teollistumisen myötä. Eniten hyötyä panimoille oli vuonna 1714 kehitetystä lämpömittarista ja vuonna 1765 kehitetystä höyrykoneesta. Myöhemmin vuonna 1843 keksitty sokeripitoisuuden mittaamiseen käytetty sakkarometri oli kenties hyödyllisin tähän mennessä keksitty apuväline. 1700-luvulla yleistynyt paloviina yritti horjuttaa oluen asemaa yksinvaltiaana, mutta edes Suomessa olutkulttuuri ei kuollut, vaikka alkoholin myynti maaseudun kaupoissa kiellettiin vuonna 1883. (Salmi 2003, 9-10 ja 12.)

1900-luvun vaihteessa maailman panimoteollisuus oli huipussaan. Pikkuhiljaa suuret panimot yleistyivät ja pienpanimot jäivät jalkoihin. Tekniikka kehittyi ja automatisoitui ja oluen laatu parani muuttuen samalla tasalaatuisemmaksi. Samoihin aikoihin olutta alettiin pitää alkoholijuomana. Suomessa panimoteollisuutta horjutti pahasti vuonna 1919 säädetty kieltolaki. Se kuitenkin kumottiin pian ja vuonna 1932 Oy Alkoholiliike Ab perustettiin. Olutkulttuuri ei kuitenkaan palautunut entiselleen ennen kuin keskiolut vapautettiin vuonna 1969. Suomen olutseura perustettiin vuonna 1989 ja ensimmäinen ravintolapanimo avattiin Helsinkiin vuonna 1993. Nykyään panimoteollisuus voi hyvin ja pienpanimot ovat yleistyneet suosion kasvaessa. (Salmi 2003, 10–13.) Olutkulttuuri on edelleen parhaimmillaan Keski-Euroopassa, mistä se on alkanutkin (Sysilä 1995, 6).

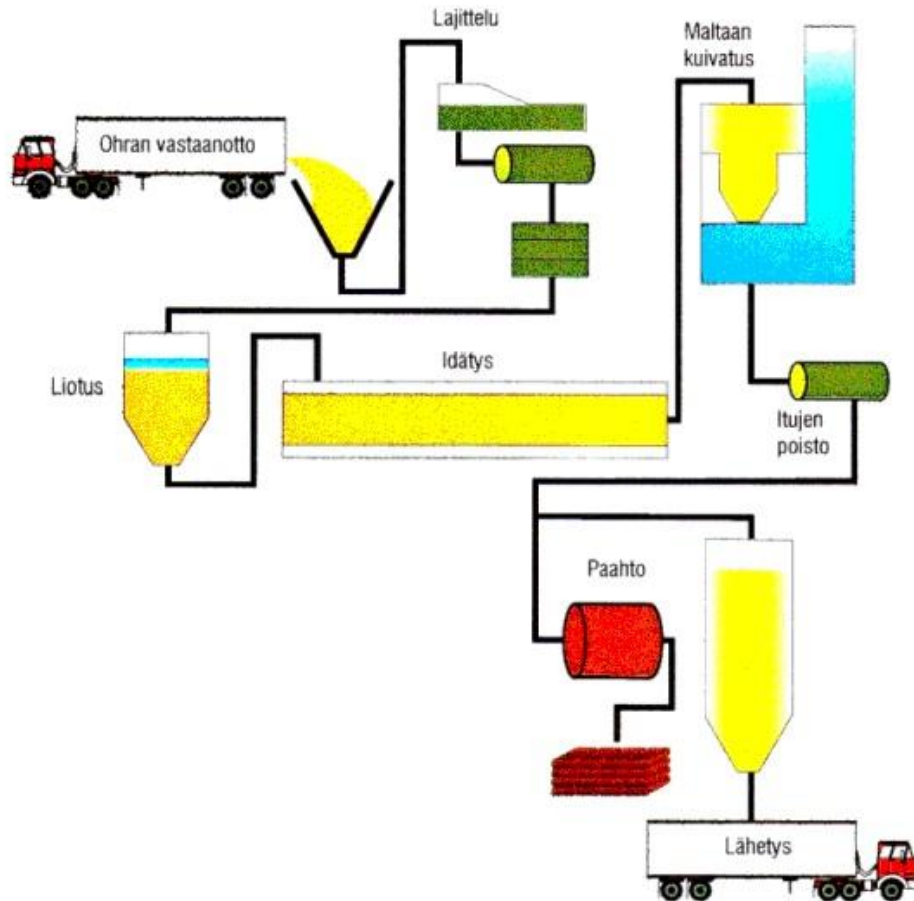
## **2.2 Mallastus ja mäskäys**

Mallastuksen merkitys panimoteollisuudessa on suuri. Mallastuksen seurauksena jyvää tuottaa entsyymejä, jotka panimoissa tapahtuvassa mäskäyksessä hajottavat jyvän sisältämät yhdisteet helpommin käytettävään muotoon. (Enari & Mäkinen 1983, 10.) Entsyymien muodostumisen lisäksi jyvää pehmenee prosessin aikana möyhentyvään muotoon ja ei-toivotut ominaisuudet, kuten karvas maku ja rakeinen olomuoto häviävät (Bamforth 2006, 4).

Mallastus on yksinkertaisuudessaan ohran tai muun jyvän hallittua idättämistä. Se koostuu useista vaiheista, joiden tarkoituksena on kehittää jyvän entsyymipotentiaalia, muokata soluseiniä ja proteiineja, kehittää muun muassa värejä ja makuja sekä vähentää tärkkelyksen pilaantumista ja juuri-itujen kasvua. (Gales 2007, 19.) Mallastuksen kaikki vaiheet on esitetty alla olevassa kuviossa (kuvio 1).



### Kaaviokuva mallastusprosessista



KUVIO 1. Mallastusprosessi (Home 2012, muokattu)

Mallastuksen ensimmäisessä vaiheessa jyviä liotetaan 14–18 °C:n lämpöisessä vedessä noin kaksi vuorokautta. Tämän seurauksena jyvien kosteus kohoaa 42–46 prosenttiin. Liuotuksen aikana vesi vaihdetaan useasti ja altaan pohjasta puhalletaan tasaisin väliajoin ilmaa, jotta jyvät saavat happea. Kun jyvien kosteusprosentti on riittävän korkea, voidaan jyvät siirtää liotuslaarista lattialle tai itämislaareihin ja siirtyä mallastuksen seuraavaan vaiheeseen. (Bamforth 2006, 4.)

Toisessa vaiheessa jyviä idätetään 16–20 °C:n lämpötilassa kolmesta viiteen päivään riippuen siitä, millaista mallasta halutaan. Idättämisen aikana entsyymit hajottavat soluseiniä ja joitakin proteiineja, jolloin jyvän rakenne pehmenee. Mäskäyksen aikana tärkkelystä hajottavat, tärkeät amylaasi-entsyymit syntyvät mallastuksen tässä vaiheessa. (Bamforth 2006, 4.)

Mallastuksen viimeinen vaihe, kuivatus, pysäyttää itämisen. Jyviä kuivatetaan halutulle mallastyypille sopivassa lämpötilassa kunnes niiden kosteusprosentti on alle 5. (Bamforth 2006, 4.) Kuivauksen aikana osa entsyymeistä denaturoituu, mutta esimerkiksi  $\alpha$ -amylaasi on stabiili vielä melko korkeissakin lämpötiloissa (Gales 2007, 19). Mitä nopeampi kuivatusprosessi on ja mitä korkeammassa lämpötilassa se tapahtuu, sitä tummempaa ja ”palaneemman” makuista mallasta saadaan (Bamforth 2006, 4).

Maltaan mäsikäysprosessi tapahtuu panimoissa ja sen tarkoituksena on aktivoida jyvän mallastuksen viimeisessä vaiheessa pysäytetty entsyymitoiminta. Rouhittu mallas sekoitetaan veteen, jolloin muodostuu puuromainen mäski. (Sysilä 1995, 59.) Veden laatu voi vaikuttaa mäskin ominaisuuksiin. Esimerkiksi alet on historiallisesti valmistettu vedestä, jonka kalsiumpitoisuus on korkea ja kuuluisat pilsnerit matalan kalsiumpitoisuuden vedestä. (Bamforth 2006, 4.) Mäskin lämpötila nostetaan aluksi 35 °C:n lämpötilaan, jolloin  $\beta$ -glukaani hydrolysoituu. Tämän jälkeen lämpötilaa nostetaan mäsikäysohjelman mukaisesti pitäen se aina jonkin aikaa tietyssä lämpötilassa. Näiden taukojen aikana tapahtuu kullekin lämpötila-alueelle ominaista entsyymitoimintaa. Esimerkiksi 50 °C:n lämpötilassa proteiinit hydrolysoituvat ja 65 °C:n lämpötilassa tärkkelys muuttuu homogeeniseksi ja alttiiksi entsyymeille, jolloin muodostuu sokereita. 75 °C:n lämpötilassa muodostuu dekstriinejä ja mäsikäys päättyy. (Sysilä 1995, 65.)

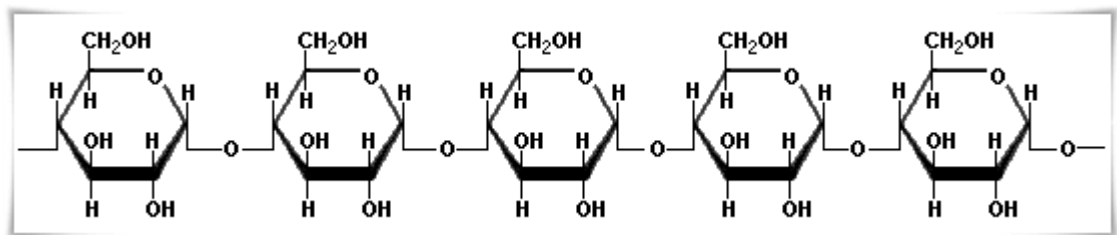
Mäsikäyksen lopputuloksena saadaan vierre, joka sisältää paljon sokereita ja aminohappoja, joita hiiva voi käyttää ravinnokseen käymisprosessissa. Mäsikäyksen jälkeen vierre suodatetaan ja keitetään, jolloin kaikki entsyymit denaturoituvat ja vierre steriloituu. Tämän jälkeen voidaan aloittaa oluen paneminen. (Bamforth 2006, 4.)

### 2.3 Entsyymitoiminta

Osa mäsikäyksessä toimivista entsyymeistä, kuten  $\beta$ -amylaasi, on läsnä itämättömässä jyvässä, mutta osa entsyymeistä, kuten  $\alpha$ -amylaasi ja  $\beta$ -glukanaasi syntetisoituvat mallastuksen aikana. Monen entsyymin syntetisointi perustuu endogeenisten gibberelliinien eli kasvihormonien toimintaan. Näin ollen mallastaja voi nostaa esimerkiksi  $\alpha$ -amylaasin tuotantoa lisäämällä eksogeenistä gibberelliinihappoa. Myös kasvuympäristö voi vaikuttaa entsyymitasoihin, ja mallastuksen parametreja, kuten lämpötilaa, itämisa-

kaa tai kosteusprosenttia muuttamalla voidaan vaikuttaa entsyymien kehittymiseen. (Gales 2007, 19.)

Itämisen aikana syntyvillä hydrolyyttisillä entsyymeillä on tärkeä tehtävä tärkkelyksen hajottamisessa sokereiksi ja proteiinien hajottamisessa aminohapoiksi. Sokerit ja aminohapot ovat vesiliukoisia ja välittyvät alkion ravinnoksi ja myöhemmin hiivan toiminnan energianlähteeksi.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -amylaasit vastaavat tärkkelyksen hydrolysoinnista.  $\alpha$ -amylaasi katkoo satunnaisesti alla esitetyn glukoosiyksiköistä koostuvan amyloosiketjun (kuvio 2) 1,4-sidoksia.  $\beta$ -amylaasi katkoo järjestelmällisesti maltoosimolekyylejä eli kahden glukoosimolekyylin mittaisia pätkiä 1,4-sidosten kohdalta ketjun ei-pelkistävästä päästä. Kumpikaan entsyymi ei kykene pilkkomaan 1,6-sidoksia, joten haaroittuneesta ketjusta jää aina jäljelle käymiskelvottomia sokereita eli rajadekstriinejä. (Sysilä 1995, 35–36.)



KUVIO 2. Amyloosiketju (Zamora 2013, muokattu)

Tärkkelyksen hydrolysoituminen sokeriksi on onnistuneen käymisen kannalta ensiarvoisen tärkeää, joten tärkkelystä hajottavat entsyymit,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -amylaasi, ovat mallastuksen kannalta kiinnostavimmat. Niiden pitoisuudet vaikuttavat merkittävästi maltaan laatuun. Erityyppisillä maltailla on erilainen entsyymiaktiivisuus ja riippuen siitä, milaista olutta ollaan valmistamassa, täytyy maltaan entsyymiaktiivisuus olla tietyllä tasolla. (Sysilä 1995, 39.)

$\alpha$ - ja  $\beta$ -amylaasin lisäksi mallastuksessa syntetisoituu proteiineja aminohapoiksi pilkkovia proteinaaseja ja peptidaaseja sekä  $\beta$ -glukaania hydrolysoivia glukanaaseja (Sysilä 1995, 38).  $\beta$ -glukaani on tärkkelyksen tavoin glukoosipolymeeri, joka on lyhyinä ketjuina vesiliukoinen (Sysilä 1995, 34). Jotta valmis mallas sisältäisi mahdollisimman paljon sokereita, täytyy sen proteiinipitoisuuden olla verrattain pieni. Proteiineja kuitenkin tarvitaan, sillä alkio itsessään käyttää itäessään sokereiden lisäksi aminohappoja.

Myös hiiva kykenee hyödyntämään valmiin maltaan aminohappoja aineenvaihdunnassaan. (Sysilä 1995, 38.)

Kaikki entsyymit ovat herkkiä korkeille lämpötiloille, joten mallastuksen viimeisessä vaiheessa, kuivatuksessa, denaturoituu väkisin jonkin verran entsyymejä. Tärkeintä kuitenkin on, että kuivauksen jälkeen maltaaseen jää tarpeeksi entsyymejä, jotta maltaan sisältämä tärkkelys hydrolysoituu täydellisesti. (Sysilä 1995, 38–39.) Tämä ei yleensä ole ongelma, jos ollaan valmistamassa niin sanottua täysmallasolutta, eli kaikki uute tulee maltaasta. Jos kuitenkin käytetään ulkoista uutelähdettä, on tärkeää, että maltaan entsyymiaktiivisuus on korkea. (Salmi 2003, 19.)

## 2.4 Pilsnermallas ja entsyymimallas

Kuten aiemmin on todettu, maltaan kuivauslämpötilalla ja -ajalla voidaan vaikuttaa sen ominaisuuksiin, joista tärkein on entsyymiaktiivisuus. Yleisin mallastyyppi on pilsnermallas, jonka kuivauslämpötila on 70–90 °C. Koska lämpötila on näin alhainen, suurin osa entsyymeistä on tallella ja näin ollen entsyymiaktiivisuus on korkea. Pelkästä pilsnermaltaasta valmistetaan yleisimmin vaaleaa lager-olutta. Jos halutaan valmistaa tummempia oluita, tarvitaan pilsnermaltaan lisäksi muita maltaita, esimerkiksi väri- tai karamellimallasta. Näitä sekoittamalla saadaan erilaisia, tiettyntyylisten oluiden vaatimukset täyttäviä mallassekoituksia. (Sysilä 1995, 39–40.)

Entsyymimaltaan entsyymiaktiivisuus on nimensä mukaisesti hyvin korkea. Sitä käytetäänkin pieninä määrinä muiden maltaiden ohella nostamaan niiden entsyymiaktiivisuutta. Entsyymimaltaissa ei alhaisen kuivauslämpötilan takia ole juurikaan väri- ja makuaineita (flavouraineita). (Sysilä 1995, 41.) Sellaisenaan entsyymimallasta käytetään viskimaltaana, jolloin se toimii entsyymilähteenä ja tarvittava tärkkelys saadaan jostain halvemmasta lähteestä (Kinanen 1972, 10).

Näiden maltaiden lisäksi yleisimpiä mallastyyppkejä ovat Wiener- ja Münchermaltaat, jotka kuivataan pilsnermallasta korkeammissa lämpötiloissa ja ovat näin ollen tummempia ja niiden entsyymiaktiivisuus on alhaisempi. Karamelli- ja värimaltaat eivät sisällä lainkaan entsyymejä, sillä ne kuivataan todella korkeissa lämpötiloissa. Värimaltaan kohdalla puhutaan usein paahtamisesta kuivauksen sijaan. (Sysilä 1995, 40.)

## 2.5 Oluiden lajittelu

Oluet lajitellaan pääasiassa valmistuksessa käytetyn hiivan perusteella pinta- ja pohjahiivaoluisiin. Pintahiivaoluita valmistetaan yleisimmin Iso-Britanniassa, Irlannissa, Belgiassa ja jonkin verran myös Saksassa. (Sysilä 1995, 15.) Pintahiivaoluiden yleisnimitys on ale ja ne voidaan jakaa 22 alaluokkaan niiden ominaisuuksien, kuten alkoholipitoisuuden, kantavierteen, katkeruuden ja tarjoilulämpötilan, perusteella. Ne käyvät pohjahiivaoluita huomattavasti korkeammassa lämpötilassa, yleensä noin 15–25 °C:n lämpötilassa. Nämä alet ovat aromikkaampia ja valmistuvat pohjahiivaoluita nopeammin. Käymisen aikana hiiva kerääntyy vierteen pinnalle, josta se kerätään talteen uudelleen käyttöä varten. Pitkälle 1800-luvulle kaikki oluet olivat pintahiivaoluita, mutta nykyään ne kattavat vain noin 5 % maailman oluentuotannosta. (Salmi 2003, 31.)

Pohjahiivaoluiden yleisnimitys on lager, joka johtuu niiden pitkästä varastokäymisestä (saks. lager = varasto) (Sysilä 1995, 27). Ne voidaan jakaa ominaisuuksiensa perusteella yhdeksään alaluokkaan (Salmi 2003, 51). Pohjahiivaoluet käyvät melko alhaisessa lämpötilassa (8–12 °C:n lämpötilassa), jonka seurauksena hiiva ei juuri vaikuta oluen flavoriin. Se muotoutuu vain käytetystä mallassekoituksesta, mäskästekniikasta ja humalalajikkeesta. Näin ollen lager-oluet voivat olla väriltään kaikkea vaaleasta lähes mustaan. (Sysilä 1995, 27.) Käymisen aikana hiiva kerääntyy nimensä mukaisesti vierteen pohjalle, josta se kerätään talteen. Perinteikkäitä lagereita valmistetaan pääasiassa Saksassa ja Tšekissä ja vaalea lager on näistä maailman yleisin oluttyyppi. (Salmi 2003, 44).

Näiden kahden pääryhmän lisäksi erotetaan usein myös kolmas ryhmä, perinneoluet. Ne käyvät lämpimässä (noin 15–25 °C:n lämpötilassa), jonka seurauksena käymisaromit ovat hyvin voimakkaita. Kyseisiä oluita ovat suomalainen sahti, belgialainen lambic ja saksalainen ruisolut. Lambic on sahdin ohella yksi maailman vanhimmista oluttyypeistä, ja siihen ei lisätä teollista hiivaa, vaan se käy villihiivojen avulla. Sahdin valmistuksessa taas käytetään pintahiivaa. Sahtimaisia ominaisuuksia löytyy myös harvinaiseksi käyneestä ruisoluesta. (Salmi 2003, 52–54.)

### 3 AUTOMATISOITU VESIKEMIAN ANALYSAATTORI

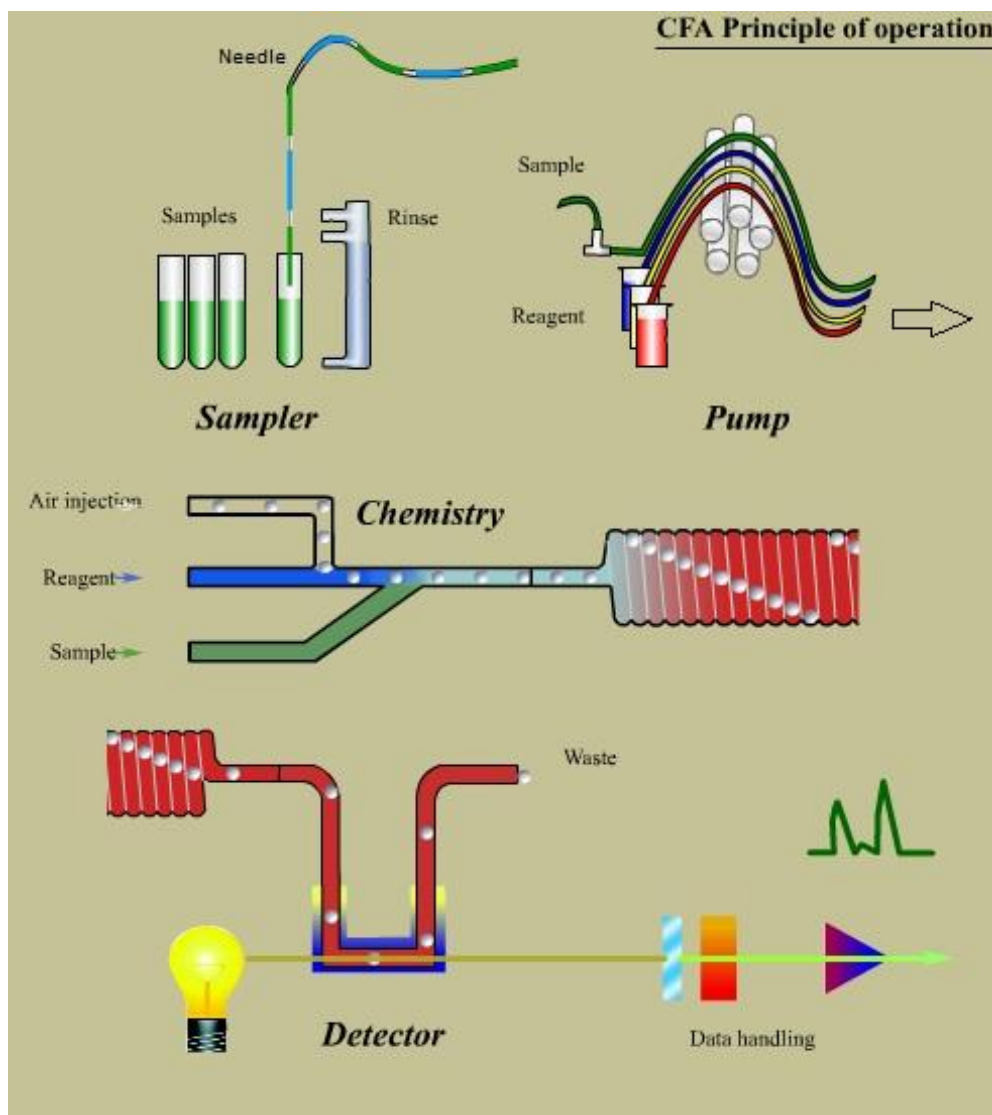
Monikäyttöisen SAN<sup>++</sup> Continuous flow – analysaattorin on suunnitellut ja valmistanut yhtiö nimeltä Skalar. Skalar on Alankomaissa vuonna 1965 perustettu, laboratoriovälineitä tuottava yritys. Skalar on keskittynyt pääasiassa automatisoitujen menetelmien ja niihin tarvittavien laitteiden kehitykseen. Näiden lisäksi Skalar on kehittänyt myös laitteidensa käyttämät ohjelmistot, jotta analyysisysteemit olisivat täysin automatisoituja aina kalibroinnista tulosten käsittelyyn asti. Perustamisensa jälkeen yhtiöstä on kasvanut monikansallinen yritys, jolla on tytäryhtiöitä ympäri Eurooppaa ja Pohjois-Amerikkaa. (Skalar 2010.)

Skalar:lla on kuusi toiminnallista tuotelinjaa. Ensimmäinen tuotelinja on TOC/DOC/TN/Proteiini – analysaattorit (Formacs<sup>SERIES</sup> ja Primacs<sup>SERIES</sup>), joka on täysin automatisoitu systeemi ja kykenee mittaamaan korkeita ja matalia TOC- ja TN-pitoisuuksia kiinteistä ja nestemäisistä näytteistä. TOC ja TN kertovat näytteen orgaanisen kokonaishiilen ja kokonaistypen määrän. DOC kertoo näytteen liuenneen orgaanisen hiilen määrän. Toinen tuotelinja on kehitetty teollisuuden prosessivirtojen laadunvalvontaan ja on nimeltään On-line prosessianalysaattori. Kolmas tuotelinja on nimeltään SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattori ja se on esitelty tarkemmin jäljempänä. Neljäs tuotantolinja tuottaa robottianalysaattoreita, joiden tehtävänä on automatisoida tarkkuutta vaativia manuaalisia menetelmiä tulosten tarkentamiseksi ja toistettavuuden parantamiseksi. Viidennen tuotantolinjan Fluo-Imagers – laitteet (BluVision<sup>TM</sup>) on kehitetty orgaanisten epäpuhtauksien määrittämiseen vedestä. Kuudes tuotantolinja on nimeltään ToxTracer, ja kyseinen systeemi on kehitetty vesinäytteiden pikaseulontaan valoa emittoivien bakteerien havaitsemiseksi. (Skalar 2010.)

Skalar tekee jatkuvaa tutkimustyötä ja kehittää laitteitaan vastaamaan yhä paremmin kysyntää. Tällä hetkellä kaikki kuusi toiminnallista linjaa ovat täysin automatisoituja laitteesta ohjelmistoon ja tulosten raakakäsittelyyn asti. Skalar:n tavoitteena on tuottaa luotettavia ja helppokäyttöisiä laitteita suurten ja pienten laboratorioden rutiinianalyysiin. (Skalar 2012.)

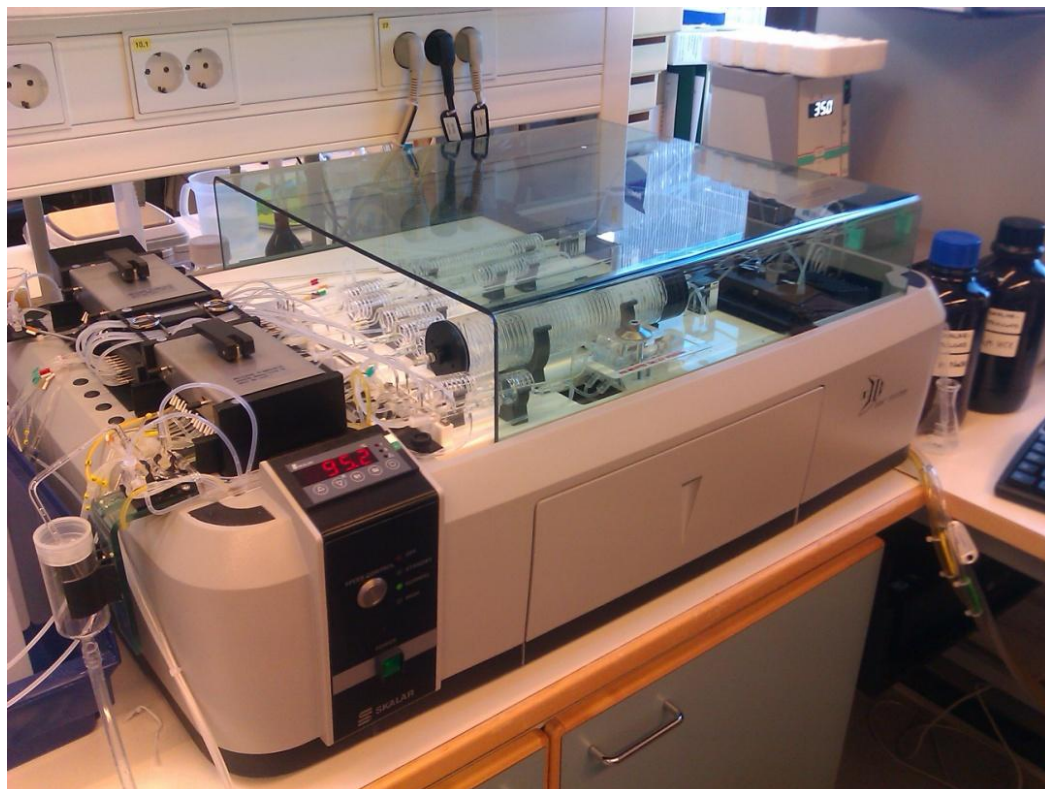
### 3.1 SAN<sup>++</sup> Continuous Flow -analysaattorin toimintaperiaate

Continuous Flow – analysaattorin toiminta perustuu segmentoituun virtaukseen, jossa segmentit syntyvät ilmakuplien avulla. Toimintaperiaatetta on selvitetty alla olevassa kuvassa (kuvio 3). Reagenssit ja näytteet pumpataan putkistoon, jossa ne sekoittuvat ja käyvät läpi saman käsittelyn ennen detektorille saapumista. (Skalar 2010.) Toimintaperiaate on kehitetty jo vuonna 1957, jolloin periaatetta hyödyntävä laite oli nimeltään AutoAnalyzer. Idea on pysynyt samana tähän päivään asti, mutta laitteita on kehitetty jatkuvasti paremmiksi ja tehokkaammiksi. Täysautomatisointi mahdollistui vasta tietotekniikan kehityttyä. (Schwartz 1973, 739.) Kyseinen toimintaperiaate estää ristikonaminointia ja parantaa toistettavuutta manuaalisiin menetelmiin nähden, sillä kyseessä on suljettu systeemi, joka tuottaa aina samanlaisen sekoituksen eri reagensseja (Skalar 2012).



KUVIO 3. Continuous flow – analysaattorin toimintaperiaate (Skalar 2012, muokattu)

Analysaattoriin voidaan valita erilaisia moduuleja riippuen siitä, mitä analyysijä halutaan suorittaa. Yhteen kemialliseen yksikköön on mahdollista liittää neljä itsenäistä moduulia ja kemiallisia yksiköitä voi olla laitteeseen kytkettynä neljä. Yhdelle näytteelle voidaan näin ollen suorittaa jopa 16 analyysia samanaikaisesti. Kemiallinen yksikkö on esitetty alla olevassa kuvassa (kuva 1). Kaikki analyysit tapahtuvat samalla periaatteella, mutta reagenssien ja näytteiden käsittely sekä detektointimenetelmä riippuvat täysin analyysistä. (Skalar 2010.)



KUVA 1. SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattorin kemiallinen yksikkö kolmella moduulilla

Kemiallinen yksikkö on analysaattorin tärkein osa. Sitä voi muokata omiin tarpeisiinsa sopivaksi valitsemalla haluamansa näytteensyöttäjän ja toiminnalliset moduulit sekä detektorit suoritettavien analyysien mukaan. Kemiallinen yksikkö voi suorittaa monenlaisia toimintoja automaattisesti niissä moduuleissa, joissa ne ovat tarpeellista ja mahdollista. Näitä toimintoja ovat muun muassa liuosten laimennus ja lisäykset, sekoitus, lämmitys, dialyysi, uuttaminen, tislauk, hydrolyysi, ioninvaihto sekä uutto- että faasieroitus. (Skalar 2012.)



SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattoria käytetään rutiinianalyyseissä sen helppouden ja luotettavuuden takia. Yleisimmät käyttökohteet tälle laitteelle ovat ympäristöanalytiikka, lääketiede ja elintarviketeollisuus. Ympäristöanalytiikassa sitä käytetään erilaisten yhdisteiden määrittämiseen vesi- ja maanäytteistä sekä lannoitteista. Elintarviketeollisuus hyödyntää laitetta ruokien ja juomien, kuten oluen, viinin ja maidon analysoinnissa. Lääketieteessä laitetta käytetään sen lähes rajattomien analyysimahdollisuuksien johdosta. Laitteella voi analysoida väriä, tiheyttä, pH:ta ja lähes rajattoman määrän yhdisteitä aina metalleista vitamiineihin ja muihin yhdisteisiin kuten aminohapot, etanoli, tärkkelys ja urea. (Skalar 2012.) Suomessa laite on tiettävästi mallasteollisuuden lisäksi myös ympäristöanalytiikan laboratorion käytössä.

### 3.2 Käyttö mallasteollisuudessa

Mallasteollisuudessa on kolme tärkeää analyysimenetelmää, joilla mitataan näytteen diastaattista voimaa,  $\alpha$ -aminotypen määrää sekä  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuutta. Nämä kaikki kolme analyysiä on mahdollista suorittaa samanaikaisesti SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattorilla, kun siihen on liitetty kolme erillistä moduulia, yksi jokaiselle analyysille. (Skalar 2010.) Kyseisellä analysaattorilla on mahdollista suorittaa myös muita mallasteollisuuden analyyskejä, mutta ne eivät olleet ajankohtaisia laitteen käyttöönoton yhteydessä.

Diastaattinen voima (DV) kuvaa näytteen  $\alpha$ - ja  $\beta$ -amylaasientsyymien yhteisaktiivisuutta erottelematta niitä. DV:n automatisoitu menetelmä perustuu tärkkelysreaktiossa muodostuneiden pelkistävien sokereiden hapettamiseen korkeassa lämpötilassa (95 °C). Hapettimena toimiva kaliumheksasyanoferraatti pelkistyy ferrisyanidiksi, ja sen aiheuttama absorbanssin aleneminen mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 420 nm. (Skalar 2010.)

Alfa-aminotypen eli vapaan aminotypen (FAN) määrä kertoo, kuinka paljon hydrolysoituneiden proteiinien vapaita aminopäitä näytteessä on. Peptidit ja vapaat aminohapot ovat hiivan ravintoa, joten niiden pitoisuus on tärkeä parametri panimoteollisuudessa. FAN:n automatisoitu menetelmä perustuu ninhydridi-menetelmään, jossa aminohapot dekarboksyloidaan ja pelkistynyt ninhydridi reagoi pelkistymättömän ninhydridin ja vapautuneen ammoniakkin kanssa muodostaen sinikeltaisen väriyhdisteen. Kaliumjodaa-

tin lisääminen pysäyttää reaktion. Muodostunut yhdiste mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 570 nm. (Skalar 2010.)

$\alpha$ -amylaasin menetelmä perustuu reaktioon, jossa näyte sekoitetaan ensin  $\beta$ -rajadekstriinisubstraattiin ja inkuboidaan 35 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia, minkä jälkeen se sekoitetaan jodiliuokseen, jossa tärkkelyksen eli dekstriinin pilkkoutumisaste aiheuttaa ruskeansävyisen värin. Värin tummuus kertoo pilkkoutumisasteesta; mitä vaaleampi sävy, sitä korkeampi pilkkoutumisaste. Värireaktion aiheuttama absorbanssin alenema mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 610 nm. (Skalar 2010.)

## 4 VALIDOINTI

### 4.1 Tarkoitus ja hyödyt

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida mallasteollisuuden kolme tärkeää menetelmää Viking Malt Oy:n laboratorion uudelle SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattorille. Koska laite oli juuri saapunut laboratorioon, sitä ei ollut ehditty testaamaan kunnolla kaikkien kolmen menetelmän osalta. Tämän seurauksena päädyttiin validoimaan vain kaksi menetelmää, diastaattisen voiman ja  $\alpha$ -aminotypen automatisoidut menetelmät. Näytteinä toimivat pääasiassa ohra- ja mallasnäytteet ja automatisoidut menetelmät perustuvat Skalar:n menetelmäohjeisiin.

Entiset manuaaliset menetelmät olivat validoituja ja automatisoidut menetelmät toimivat käytännössä samoilla periaatteilla. Menetelmät ovat laboratoriossa jokapäiväisessä käytössä ja laitteella suoritetaan myös kansainvälisen vertailun analyysijä. Vaikka menetelmien automatisointi parantaa jo sinällään tulosten tarkkuutta ja toistettavuutta, haluttiin, että menetelmät ovat validoituja. Näin voidaan varmistua laitteen toimivuudesta sekä kaikkien tulosten oikeellisuudesta ja toistettavuudesta.

Validoinnin tarkoitus on varmistaa menetelmän sopivuus sille suunniteltuun tarkoitukseen. Jotta menetelmä ja sen antamat tulokset ovat luotettavia, on niiden täytettävä tietyt kriteerit. Nämä kriteerit voivat analyysistä riippuen tulla joko asiakkaalta, laboratoriolta itseltään tai lainsäädännöstä (esimerkiksi elintarviketeollisuudessa). (Saari 2010.) Validoinnin laajuus riippuu täysin siitä, minkälaisia muutoksia menetelmään on tehty sen käyttötarkoituksen, laitteiston, henkilökunnan tai muiden olosuhteiden johdosta. Myös kansainväliset standardoidut menetelmät on hyvä validoida edes suppeasti käyttölaboratorion toimesta, jotta voidaan varmistua sen luotettavasta toiminnasta laboratorion laitteilla, näytteillä ja analysoitavilla pitoisuusalueilla. (Ehder 2005.)

Laboratorioiden väliset vertailutestit ovat hyvä tapa tutkia menetelmän luotettavuutta. Vaikka näiden testien järjestäminen voi olla hankalaa, kertovat tulokset kuitenkin menetelmän todellisen tarkkuuden, luotettavuuden ja toistettavuuden. Laboratorion sisäinen validointi on helpompaa järjestää, ja kun käytetään useita parametreja, validointi on yleensä luotettava. (Saari 2010.)

## 4.2 Validointiparametrit

Määritettävät parametrit riippuvat täysin validoitavasta menetelmästä. Validointisuunnitelmaa tehdessä on otettava huomioon mihin menetelmää käytetään ja onko kyseessä kvalitatiivinen vai kvantitatiivinen analyysi. Myös näytteiden homogeenisuus, mahdollisesti analyysiä häiritsevä matriisi sekä tutkittavien yhdisteiden mitta-alue on otettava huomioon. (Saari 2010.) Yleisimmin käytettyjä parametreja ovat mitta-alue ja lineaarisuus, määrittämis- ja toteamisraja, toistettavuus, uusittavuus, oikeellisuus ja tarkkuus sekä laajennettu mitta-aluevarmuus (Ketola 2005). Muita parametreja ovat muun muassa selektiivisyys ja spesifisyys, herkkyys, häiriöalttius ja stabiilius (Saari 2010).

Menetelmän lineaarisuudella tarkoitetaan sen kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä korrelaatio tulosten ja näytteiden mitattavan aineen pitoisuuden välillä. Lineaarisuuden avulla määritetään mitta-alue. Toteamisraja kertoo määritettävän aineen pienimmän luotettavasti mitattavan pitoisuuden. Tällöin pitoisuus eroaa vielä nollanäytteestä merkittävästi. Määrittämis- eli kvantitointiraja on kvantitatiivisen määrityksen pitoisuusalaraja. (Jaarinen & Niiranen 2008, 13.)

Tulosten oikeellisuus ja tarkkuus kertovat mitatun arvon ja todellisen arvon välisestä suhteesta, johon vaikuttaa systemaattinen ja satunnaisvirhe. Tarkkuutta mitataan usein saantoprosentin avulla, mikä kertoo menetelmän tehosta havaita mitattavan analyytin kokonaismäärä. Menetelmän toistettavuus on tärkeä suure, joka kertoo menetelmän peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyydestä, kun mittaukset suoritetaan samoissa olosuhteissa lyhyen ajan sisällä. Systeemin toistettavuus tai uusittavuus taas kertoo saman mittaussuureen mittaustulosten yhtäpitävyydestä, kun kyseessä ovat muuttuvat olosuhteet. Tämä tarkoittaa esimerkiksi mittausten suorittamista eri päivänä eri henkilön toimesta. Toistettavuuksien yleisesti hyvänä pidetty arvo on 5 %:n luokkaa, mutta korkeammatkin arvot ovat hyväksyttäviä menetelmästä riippuen. Teoreettista arvoa pienempi tulos kertoo jo todella korkeasta toistettavuudesta ja on usein lähes mahdoton saavuttaa. (Jaarinen & Niiranen 2008, 12.)

Selektiivisyys eli valikoituvuus kertoo menetelmän kyvystä havaita vain mitattava analytti, vaikka näytteessä olisi muitakin yhdisteitä. Selektiivisyyden avulla voidaan laskea taustatekijöiden aiheuttama systemaattinen virhe. Spesifisyys kuvaa menetelmän kykyä mitata vain tutkittavaa analyttia. (Saari 2010.)

Herkkyys kuvaa menetelmän kykyä havaita pienet muutokset. Kun pieni vaihtelu pitoisuudessa aiheuttaa suuren muutoksen detektorin antamassa vasteessa, menetelmä voidaan todeta herkäksi. Häiriöalttius taas kertoo menetelmän reaktioista pieniin poikkeuksiin. Jos häiriöalttius on pieni, pienet poikkeamat analyysitekniikassa eivät vaikuta tuloksiin. Menetelmän stabiiliudesta saadaan tietoa ajan kuluessa, kun huomataan miten herkkyys ja häiriöalttius muuttuvat analyysien välillä. (Saari 2010.)

Validoinnin yhteydessä voidaan määrittää myös residuaalit eli jäännökset lineaarisen regression eli pienimmän neliösumman menetelmällä. Sitä kuvaa kalibrointisuora. Suoran sopivuutta voidaan arvioida laskemalla kalibrointipisteille residuaalit ja esittämällä saadut arvot graafisesti. Excel-taulukkolaskentaohjelma laskee residuaalit ja piirtää niistä taulukot ja kuvaajat automaattisesti. Jos pisteet ovat tasaisesti viivan molemmin puolin, on kalibrointisuora todellisuudessa lineaarinen. (Jaarinen & Niiranen 2008, 25.)

Jotta validointi olisi virallisesti loppuun suoritettu, se on raportoitava oikeaoppisesti. Raportista tulee ilmetä ainakin työn tarkoitus ja toteutus, käytetty laitteisto sekä materiaalit. Käytetyt menetelmät on myös esitettävä. Muu sisältö riippuu validoinnin laajuudesta, mutta tulokset on kirjattava aina. Päättäessä todetaan täyttääkö menetelmä sille asetetut vaatimukset ja toimiiko se sille tarkoitettussa käytössä. Raportti ja alkuperäiset tulostusaineistot tulee arkistoida myöhempää tarvetta varten. (Ehder 2005.)

## 5 MENETELMIEN VALIDOINTI

### 5.1 Validointisuunnitelma

Ennen validoinnin aloittamista mietittiin, mitkä yleisimmistä validointiparametreista otettaisiin mukaan validointiin. Kyseessä oli yksioikoisella periaatteella toimiva analysaattori ja muuttumattomat liuokset. Myös näytematriisi oli lähes samanlainen jokaisessa analyysissä. Validoinnin laajuuden tarvetta vähensi myös jokaisen analyysin yhteydessä suoritettava laboratorion sisäinen laadunvarmistus standardimaltaan avulla, sekä lähes kuukausittain suoritettavat kansainväliset vertailuanalyysit. Näiden tietojen perusteella tehtiin validointisuunnitelma, jonka mukaan molemmille validoitaville menetelmille määritettiin seuraavat parametrit: lineaarisuus, systeemin toistettavuus eli uusittavuus, tarkkuus, menetelmän toistettavuus sekä toteamis- ja määrittämisrajat.

### 5.2 Työn suoritus

Työ toteutettiin määrittämällä yllämainitut parametrit päivittäisten analyysien yhteydessä. Suoritus tehtiin laitteen menetelmäohjeiden ja erillisistä lähteistä muokatun validointiohjeen perusteella (mm. MIKES). Määrittämisä ei tehty samana päivänä, mutta analysaattori ja menetelmät ovat olleet kaikissa mittauksissa samat. Myös näytteenkäsittely oli jokaisella kerralla samanlainen.

Diastaattisen voiman analysoimista varten jauhettua näytettä punnittiin sen oletetusta entsyymiaktiivisuudesta riippuen 10, 20 tai 40 g. Yleisin punnitusmäärä oli 20 g. Näyte sekoitettiin 0,5 %:een natriumkloridiliuokseen ja mäskättiin laboratorio-olosuhteissa sille tarkoitettulla laitteella. Tunnin mittaisen mäskäysprosessin jälkeen jäähtynyt näyte suodatettiin ottamalla ensimmäiset 200 ml sivuun ja seuraavat 50 ml analyysiin. Alfa-aminotypen määrittämiseen käytettiin hieman pidemmän prosessin ja korkeamman lämpötilan kautta mäskättyä vierrettä, ja siinä NaCl-liuos oli korvattu tislattulla vedellä.

Diastaattisen voiman eli DV:n analysointiin tarvittiin Brij-reagenssia sisältävä natriumkloridiliuos, tärkkelysliuos ja kaliumheksasyanoferraattiliuos. Lisäksi näyteneulan huuhteluun käytettiin pelkkää NaCl-liuosta. Alfa-aminotypen eli FAN:n määrittäystä var-

ten valmistettiin Brij-reagenssia sisältä vesiliuos, askorbiinihappoliuos, kaliumjodaattiliuos sekä ninhydriiniliuos. Huuhteluliuksena käytettiin tislattua vettä. Liuosohjeet ovat liitteenä (liite 1).

DV:n standardiliuoksiin käytettiin kaupallista E-MAAST-liuosta, joka on sekä  $\alpha$ - että  $\beta$ -amylaasia sisältävä mallasuute. Uutteesta valmistettiin ensin vahva varastoliuos pipetoimalla 4 ml uutetta 100 ml:n mittapulloon ja täyttämällä se NaCl-liuoksella merkkiin. Varastoliuksesta valmistettiin neljä standardia 20 ml:n mittapulloihin pipetoimalla sitä seuraavat määrät: 2, 4, 6 ja 8 ml. Mittapullot täytettiin NaCl-liuoksella merkkiin. Lopulliset pitoisuudet olivat 200, 400, 600 ja 800 WK-yksikköä (Windisch-Kolbach). FAN:n standardiliuoksia varten valmistettiin glysiinin varastoliuos liuottamalla 5,362 g glysiinijauhetta 100 ml:an tislattua vettä. Tätä varastoliuosta pipetoitiin 50 ml:n mittapulloihin 0,4, 0,8, 1,2 ja 1,6 ml. Mittapullot täytettiin tislatulla vedellä merkkiin. Lopulliset pitoisuudet olivat 80, 160, 240 ja 320 mg/l.

SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattorin moduuleissa oli jokaiselle ajoliuokselle oma letku, jonka kautta laite pumppasi liuoksia tietyllä virtausnopeudella laitteistoon. DV:n reaktori oli 95 °C ja FAN:n 90 °C. DV:n analyysissä oli lisäksi 35 °C:n lämpöinen vesihaude. Virtausnopeus analyysien aikana oli laitteessa vakio, 1 ml/min. Analyyseissä näyteaika oli 110 s, pesuaika jokaisen injektoinnin välissä 110 s ja ilma-aika 4s. Ennen analyysin aloittamista laitteen tuli stabiloitua puoli tuntia. Sinä aikana näytteet ja standardit laitettiin näytekippeihin ja asetettiin näytteensyöttäjään (kuva 2).



KUVA 2. SAN<sup>++</sup> Continuous Flow – analysaattorin näytteensyöttäjä

Menetelmien lineaarisuutta määritettäessä analysoitiin kaikki standardit kolme kertaa. Laitteen ohjelma on suunniteltu niin, että se kalibroi ja laskee tulokset automaattisesti standardisuoran avulla. Tuloksista ei ole siis nähtävissä erikseen absorbanssia, jota mitataan, vaan lopullinen pitoisuus. Tuloksista piirrettiin Excel-taulukkolaskentaohjelmalla kummallekin menetelmälle kuvaajat, joiden avulla voitiin arvioida niiden lineaarisuutta. Tuloksista määritettiin myös residuaalit eli jäännökset Excel:n lineaarisen regressiotoiminnon avulla.

Systeemin toistettavuutta arvioitaessa kerättiin standardimaltaan tuloksia pidemmältä aikaväliltä. Jokaisessa päivittäisessä analyysissä on mukana standardimallas, jonka pitoisuus tiedetään. Näin voidaan varmistaa, että analyysi on onnistunut, eikä tuloksissa ole minkään kontaminaation tai muun ongelman aiheuttamaa virhettä. 12 kerätystä tuloksesta laskettiin keskiarvo, keskihajonta (STD) ja suhteellinen hajonta (CV). Systeemin toistettavuutta arvioitiin alla esitetyn kaavan avulla.

$$R(\%) = t \times \sqrt{2} \times cv \times 100, \quad (1)$$

jossa

t = studentin t-jakauman arvo taulukosta

cv = suhteellinen hajonta (Ehder 2005).



Menetelmän tarkkuutta arvioitiin saantoprosentin avulla. Analyysiin valittiin näyte, jonka pitoisuuden tiedettiin olevan suunnilleen standardisuoran alkupäässä. Näytteestä otettiin neljä osaa, joista yksi oli nollanäyte, eli siihen ei tehty lisäystä. Kolmeen muuhun tehtiin mallasuutteesta valmistetulla varastoliuoksella lisäykset, joiden pitoisuudet tiedettiin. DV:n kohdalla nollanäytteen pitoisuudeksi oletettiin noin 300 WK-yksikköä ja lisäykset olivat 100, 200 ja 300 yksikköä. Lisäykset toteutettiin pipetoimalla ensin 8 ml näytettä neljään 10 ml:n mittapulloon. Nollanäyte täytettiin tislatulla vedellä merkkiin, toiseen pulloon lisättiin varastoliuosta 0,5 ml, kolmanteen 1,0 ml ja neljanteen 1,5 ml. Lopuksi mittapullot täytettiin tislatulla vedellä merkkiin ja analysoitiin.

FAN:n kohdalla nollanäytteen pitoisuudeksi arvioitiin noin 180 mg/l. Lisäykset tehtiin samalla periaatteella standardin varastoliuoksesta pipetoimalla ensin 5 ml näytettä 10 ml:n mittapulloon. Nollanäyte täytettiin vedellä merkkiin, toiseen mittapulloon lisättiin varastoliuosta 50 µl, kolmanteen 75 µl ja neljanteen 100 µl. Mittapullot täytettiin tislatulla vedellä merkkiin ja analysoitiin. Saantoprosentti laskettiin molemmille menetelmille seuraavan kaavan mukaisesti

$$saanto\% = ((C1 - C2) \div C3) \times 100, \quad (2)$$

jossa

$C1$  = lisäyksen sisältävän näytteen pitoisuus

$C2$  = nollanäytteen pitoisuus

$C3$  = tunnetun lisäyksen määrä (Ehder 2005).

Menetelmän toistettavuus määritettiin samalla kaavalla (2) kuin systeemin toistettavuus. Erona oli se, että tässä käytettiin samasta näytteestä samalla analyysikerralla saatua kuutta peräkkäistä tulosta. Näin ollen virheen mahdollisuus on pienempi, kuin pidemmältä aikaväliltä kerättyjen tulosten kohdalla. Näytteenä oli kaupallinen analyysinäyte, jonka pitoisuuden tiedettiin osuvan standardisuoran alkupuolelle.

Toteamis- ja määrittäysrajan laskemista varten analysoitiin kaikki standardit kolme kertaa. Tuloksista piirrettiin molemmille menetelmille kolme standardisuoraa. Suorien leikkauspisteistä laskettiin keskiarvo ja poikkeamat jokaiselle arvolle. Poikkeamista ja kulmakertoimista otettiin keskiarvo, jonka avulla laskettiin toteamisraja (LoD) ja määrittäysraja (LoQ) seuraavien kaavojen avulla:

$$LoD = \frac{(3 \times \text{leik.pisteiden poikkeamien KA})}{\text{kulmakertoimien KA}} \quad (3)$$

$$LoQ = \frac{(10 \times \text{leik.pisteiden poikkeamien KA})}{\text{kulmakertoimien KA}} \quad (4)$$

(IUPAC 1995).

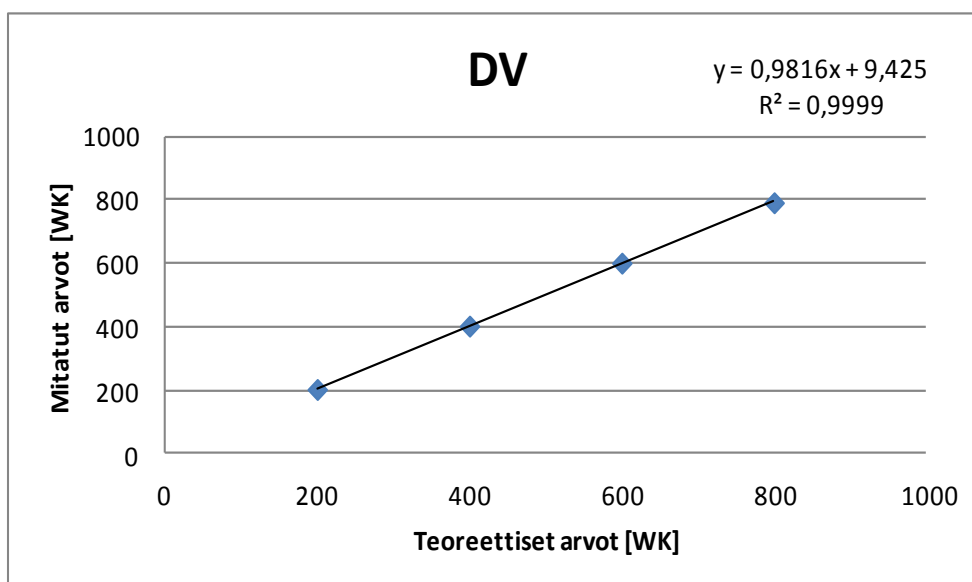
### 5.3 Työn tulokset

Lineaarisuutta määritettäessä tuloksista piirrettiin kuvaajat (kuviot 4 ja 5), joissa x-akselilla on esitetty teoreettiset arvot ja y-akselilla mitatut arvot. Ensimmäinen kuvaaja esittää DV:n lineaarisuutta ja toinen FAN:n. Tulokset on esitetty liitteenä (liite 2). Kuten kuvaajista nähdään, DV:n  $R^2$ -arvo eli selitysaste on todella lähellä arvoa 1, jolloin myös korrelaatiokerroin R on lähellä arvoa 1. FAN:n kohdalla arvo on tasan 1. Tämä tarkoittaa, että menetelmät ovat täysin lineaarisia käytettävällä mittausalueella. Myöhemmin todellisia pitoisuuksia laskettaessa DV:lle käytettiin kuvaajasta saatua kaavaa

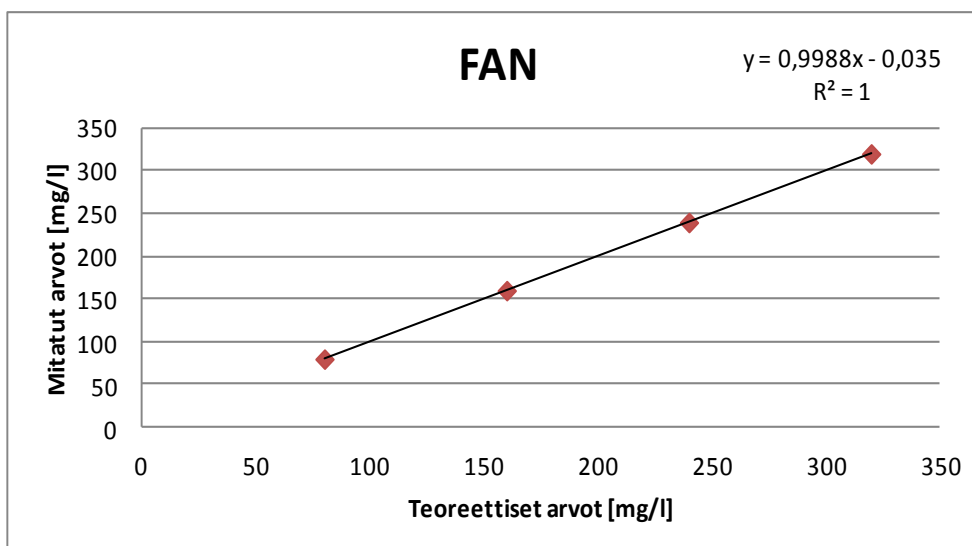
$$y = 0,9816x + 9,425, \quad (5)$$

ja FAN:lle kaavaa

$$y = 0,9988x - 0,035. \quad (6)$$



KUVIO 4. Diastaattisen voiman lineaarisuus

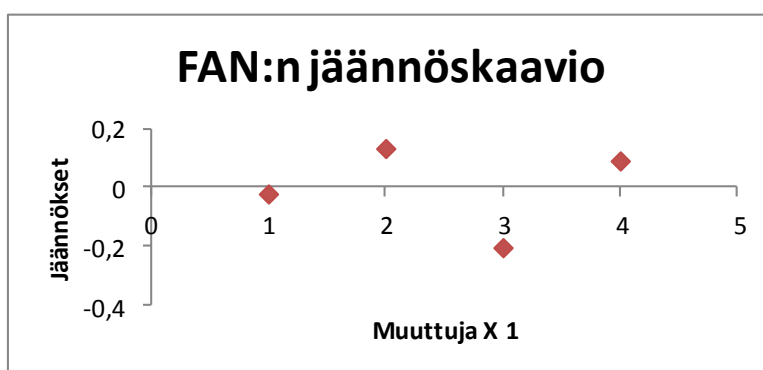


KUVIO 5. Alfa-aminotypen lineaarisuus

Lineaarisuuden yhteydessä laskettiin Excel-taulukkolaskentaohjelmalla residuaalit, eli jäännökset molemmille menetelmille. Alla on esitetty kummatkin jäännöskaaviot (kuviot 6 ja 7), joista nähdään, että FAN:n lineaarisuus on todellinen, kun pisteet ovat jakautuneet tasaisesti viivan molemmin puolin. DV:n lineaarisuus on hyvä, kun pisteitä on viivan molemmin puolin, mutta jotta se olisi yhtä hyvä kuin FAN:n, joka toisen pisteen tulisi olla viivan yläpuolella ja joka toisen alapuolella. Loput regressiotunnusluvut ovat liitteenä (liite 3).



KUVIO 6. DV:n lineaarisen regression jäännöskaavio



KUVIO 7. FAN:n lineaarisen regression jäännöskaavio

Systeemin toistettavuuden tulokset ovat liitteessä 4. DV:n analyysissä standardimaltaalle saatiin 12 tuloksen jälkeen keskiarvoksi 303,333 WK. Keskihajonta (STD) oli 12,317, jolloin suhteelliseksi hajonnaksi (CV) tuli 0,041. Aiemmin mainitussa kaavassa (1) käytettiin studentin t-jakauman arvona lukua 2,132, joka on yleisin neljälle vapausasteelle 95 %:n luotettavuustasolla käytetty arvo (Chang 2012). Systeemin toistettavuus DV:lle oli näin ollen

$$R = 2,132 \times \sqrt{2} \times 0,041 \times 100 = 12,24 \, \%$$

FAN:n standardimaltaalle tuli keskiarvoksi 151,167 ja keskihajonta oli 2,791. Suhteellinen hajonta oli siis 0,018. T-arvona käytettiin samaa kuin DV:lle, jolloin tulos oli seuraava:

$$R = 2,132 \times \sqrt{2} \times 0,018 \times 100 = 5,57 \, \%$$

Tulokset ovat vielä hyväksyttävissä rajoissa. Jotta systeemin toistettavuus olisi paras mahdollinen, tulosten tulisi olla 5 % luokkaa. Kyseessä on kuitenkin teoreettinen arvo, jota ei välttämättä voida saavuttaa kaikilla laitteilla ja menetelmillä. Voidaan myös todeta, että menetelmää validoitaessa menetelmän toistettavuus on systeemin toistettavuutta tärkeämpi parametri.

Tarkkuutta saantoprosentin avulla määritettäessä saatiin hyväksyttäviä tuloksia. Tulokset ovat kokonaisuudessaan liitteenä (liite 5). Jokaiselle lisäykselle laskettiin oma saantoprosentti aiemmin esitetyn kaavan (2) avulla. Näistä tuloksista laskettiin koko menetelmän tarkkuutta kuvaava keskiarvo. Todellista tulosta laskettaessa käytettiin kummankin menetelmän lineaarisuuden kaavaa (kaavat 5 ja 6). DV:n kohdalla saantoprosentit olivat 106, 109 ja 105. Näin ollen keskiarvoksi jäi 107 %, joka kertoo menetelmän korkeasta kyvystä havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärä. Menetelmä on siis tarkka. FAN:n kohdalla saantoprosentit olivat 111, 107 ja 107. Keskiarvoksi tuli 108 %, joka kertoo samaa kuin DV:n tarkkuus. Molemmat menetelmät ovat siis tarkkoja ja tehokkaita havaitsemaan tutkittavan aineen kokonaismäärän.

Menetelmän toistettavuuden tulokset ovat liitteenä (liite 6). Kuuden peräkkäisen mittauksen jälkeen DV:n keskiarvoksi näytteelle tuli 295,8 WK, keskihajonnaksi 3,49 ja näin ollen suhteellinen hajonta oli 0,012. Arvot on laskettu todellisia pitoisuuksia käyttämällä, jotka saatiin menetelmän lineaarisuuden kaavalla (5). Aiemmin esitettyä kaavaa (1) käyttämällä diastaattisen voiman menetelmän toistettavuuden tulokseksi saatiin

$$R = 2,132 \times \sqrt{2} \times 0,012 \times 100 = 3,56 \, \%.$$

FAN:n keskiarvoksi analysoidulle näytteelle jäi 186,55 mg/l, keskihajonnaksi 0,91 ja suhteelliseksi hajonnaksi 0,005. Kyseiset arvot on myös laskettu lineaarisuuden kaavan (6) avulla saaduista todellisista pitoisuuksista. Menetelmän toistettavuudeksi saatiin kaavan 1 avulla seuraava tulos:

$$R = 2,132 \times \sqrt{2} \times 0,005 \times 100 = 1,47 \, \%.$$

Molempien menetelmien toistettavuudet ovat alle 5 %, joka kertoo hyvästä toistettavuudesta. FAN:n toistettavuus on jopa alle 2 %. Menetelmät ovat siis toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä hyvin täsmällisiä.

Toteamis- ja määrittäysraja-analyysin tulokset on esitetty kokonaisuudessaan liitteenä (liite 7). Alla on listattu DV:n kolmen standardisuoran leikkauspisteet, poikkeamat ja kulmakertoimien keskiarvo (taulukko 1). Näitä arvoja käyttämällä laskettiin kaavojen 3 ja 4 mukaisesti menetelmälle sekä toteamisraja (LoD) että määrittäysraja (LoQ).

TAULUKKO 1. Diastaattisen voiman toteamis- ja määrittäysraja-analyysin tulokset

Leikkauspisteet	KA	poikkeama	poikk. KA	kulmakertoimet	kulmakertoimien KA
0,26		32,5917		0,9992	
51,74	32,852	18,8883	21,728	0,896	0,9377
46,555		13,7033		0,9179	

$$LoD = \frac{3 \times 21,728}{0,9377} = 69,51$$

$$LoQ = \frac{10 \times 21,728}{0,9377} = 231,71$$

Arvot ovat kyseiselle menetelmälle hyvät ja käytössä todellisiksi todetut. Nollanäyte eli vesi aiheuttaa absorbanssin, joka vastaa noin 60 WK-yksikön pitoisuutta. Tämä selittää toteamisrajan. Menetelmän pienin standardi on 200 WK-yksikköä, jota pienemmät pitoisuudet eivät ole enää lineaarisella mittausalueella. Tämän takia myös todettu määrittäysraja on hyväksyttävä. Taulukossa 2 on esitetty vastaavat tulokset FAN:lle. Alla on laskettu LoD ja LoQ taulukossa olevia arvoja käyttäen.

TAULUKKO 2. Alfa-aminotyypen toteamis- ja määrittäysraja-analyysin tulokset

Leikkauspisteet	KA	poikkeama	poikk. KA	kulmakertoimet	kulmakertoimien KA
0,005		0,03667		1	
-0,385	-0,0317	0,35333	0,2356	1,002	0,998833333
0,285		0,31667		0,9945	

$$LoD = \frac{3 \times 0,2356}{0,9988} = 0,707$$

$$LoQ = \frac{10 \times 0,2356}{0,9988} = 2,36$$

Arvot menevät hyvin rajoihin ja menetelmä on käytössä todettu tarkaksi ja tehokkaaksi. Nollanäytteen absorbanssi aiheuttaa paljon DV:tä pienemmän pitoisuuden ja pienin standardikin on vain 80 mg/l, joten on ymmärrettävää, että arvot ovat toista menetelmää paremmat. FAN:n menetelmä on lineaarinen vielä pitoisuusalueella, joka on puolet pienemmän standardin pitoisuudesta.

## 6 POHDINTA

Kun menetelmä on validoitu, sen tulokset on todettu luotettaviksi ja riittävän tarkkoiksi omaan tarkoitukseensa. Viking Malt Oy:n laboratorio vastaa tuotannon laadusta, joten validointi oli tarpeellinen. Myös menetelmien automatisointi parantaa tulosten tarkkuutta ja vähentää virheiden mahdollisuuksia, mitkä johtuvat manuaalisista toimintatavoista ja eri ihmisten tarkkuudesta ja ”käsialasta”.

Määritettyjen parametrien tulosten perusteella molempien menetelmien validointi onnistui ja tulosten tarkkuus ja luotettavuus paranivat. Näin ollen työ täytti sekä tarkoituksensa että tavoitteensa. Validoinnissa oli mukana kaikki laitteen toiminnan kannalta tärkeät parametrit, joten voidaan sanoa, että menetelmät ovat validoituja. Laajempikin validointi olisi voitu suorittaa, mutta sitä ei nähty tässä tilanteessa tarpeelliseksi.

Validoitujen menetelmien toimivuutta tarkastellaan jokapäiväisissä analyyseissä. Jokaisessa ajossa on mukana standardimallasnäyte, jonka pitoisuus tiedetään. Tämän seurauksena kaikki virheet laitteen toiminnassa tai reagensseissa huomataan nopeasti. Standardimaltaan tuloksia kirjattiin koko kesän ajan taulukkoon, jotta saatiin hyväksyttävät virhemarginaalit sekä diastaattisen voiman että alfa-aminotyypen tuloksille. Laboratorio osallistuu myös lähes kuukausittain kansainvälisiin vertailuanalyyseihin, joissa useat laboratoriot eri maissa analysoivat saman mallasnäytteen. Kyseisellä laitteella ja näillä kahdella validoidulla menetelmällä on saatu alusta lähtien tarkkoja ja vertailukelpoisia tuloksia.

Validointi onnistui hyvin, vaikka Viking Malt Oy:llä ei ollut omaa, virallista validointiohjetta. Laitteita ja menetelmiä on validoitu laboratorioalan laatustandardin edellyttämänä, analyysien vaatimalla tavalla ja tulokset on taulukoitu. Kaikkia laitteita ja menetelmiä ei voi eikä ole tarkoituksenmukaista validoida samalla tavalla samoja parametreja käyttäen. Jokainen laboratorio määrittelee itse validointimenettelynsä sen mukaan, millaisia analyysejä se suorittaa ja mihin tarkoitukseen tuloksia käytetään. Viking Malt Oy:n laboratoriolle ollaankin nyt laatimassa omaa virallista validointiohjetta, jota voidaan soveltaa validointisuunnitelmien puitteissa kaikille laitteille ja menetelmille.



## LÄHTEET

Bamforth, C. 2006. Scientific principles of malting and brewing. Minnesota: American society of brewing chemists.

Chang, A. nd. T-test: table of critical t values. Luettu 4.10.2012. [http://www.stattools.net/tTest\\_Tab.php](http://www.stattools.net/tTest_Tab.php).

Ehder T. 2005. Kemian metrologian opas. MIKES Julkaisu J6/2005. Luettu 12.11.2012. [http://www.mikes.fi/documents/upload/j6\\_05\\_b5\\_nettiin.pdf](http://www.mikes.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf).

Enari, T-M. & Mäkinen, V. 1983. Panimotekniikka. Rauma: Oy Länsi-Suomi.

Gales, P. 2007. Brewing chemistry and technology in the Americas. Minnesota: American society of brewing chemists.

Home, S. 2012. Mitä ohranjyvälle mallastuksessa tapahtuu. Päivitetty 12.3.2012. Luettu 20.11.2012. [http://www.agronet.fi/mallasohra/oo5mita\\_ohranjyvälle\\_mallastuksessa.htm](http://www.agronet.fi/mallasohra/oo5mita_ohranjyvälle_mallastuksessa.htm).

IUPAC. 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. Luettu 25.10.2012. <http://www.iupac.org/publications/pac/1995/pdf/6710x1699.pdf>.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5. – 6. painos. Helsinki: Edita.

Ketola, R. 2005. Vaativien ympäristönäytteiden kromatografisten menetelmien laadunvarmistus. Päivitetty 27.1.2005. Luettu 29.11.2012. Mikes:n julkaisu. <http://www.mikes.fi>.

Kinanen, M. (toim.) 1972. Erikoistiedoilla kohti erikoistuvaa maataloutta: Mallasohran tuotanto. Helsinki: Kauppiaitten kustannus Oy.

Saari, L. 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus. Päivitetty 13.10.2010. Luettu 25.11.2012 Eviran julkaisut: Ajankohtaista laboratoriorintamalla. [http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely\\_toiminta\\_valvonta/laboratoriotoiminta/koulutus/leena\\_saari\\_13.10.10.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoriotoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf)

Salmi, M. 2003. Pieni olutopas. Helsinki: Oy Finn Lectura Ab.

Schwartz, M. 1973. Continuous Flow Analysis. Analytical Chemistry 45 (8), 739-743.

Skalar Analytical BV. 2010. User manual.

Skalar Analytical BV. 2012. SKALAR. Luettu 25.10.2012. <http://www.skalar.com>.

Sysilä, I. 1995. Ohrapellosta etiketin taakse. 2. painos. Helsinki: Limes ry.

Zamora, A. 2013. Scientific Psychic. Luettu 4.1.2013. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html>

## LIITTEET

### Liite 1. Liuosohjeet

	Reagenssi	Raaka-aineet	Määrä	Valmistus
DV	Natriumkloridiliuos	NaCl	5g	Liuota NaCl tislattuun veteen, täytä litraksi, lisää 2ml Brij 35 -reagenssia
		Tislattu vesi	1000ml:ksi	
	Asetaattipuskuri (tärkkelysliuokseen)	Natriumasetaatti	41g	Liuota natriumasetaatti veteen, lisää etikka-happo ja täytä litraksi
		Etikkahappo 100%	29 ml	
		Tislattu vesi	1000ml:ksi	
	Tärkkelysliuos	Tärkkelys, Merck	20g	Keitä 750ml vettä, 20g tärkkelystä 50ml:aan vettä. Keitä 2min, jäähdytä huoneenlämpöön Lisää 60 ml puskuria ja täytä litraksi.
		Asetaattipuskuri	60ml	
		Tislattu vesi	1000ml:ksi	
	Kaliumheksasyanoferraatti (Säilytys tummassa pullossa)	Kaliumheksasyano-ferraatti, K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,625 g	Liuota kuivat aineet veteen, täytä litraksi ja lisää 2ml Brij 35 -reagenssia.
		Natriumkarbonaatti	20g	
		Tislattu vesi	1000ml:ksi	
FAN	Tislattu vesi+Brij 35	Tislattu vesi	1000ml:ksi	Lisää 3ml Brij 35 reagenssia
	L-askorbiinihappo	L (+)-askorbiinihappo	150mg	Liuota askorbiinihappo veteen täytä litraksi ja lisää 3ml Brij 35 -reagenssia
		Tislattu vesi	1000ml:ksi	
	Ninhydriiniliuos	Ninhydriini, C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	20g	Natriumasetaatti 800 ml:aan tislattua vettä, pH 6,7±0,1 etikkahapolla. Lis. Ninhydriini ja täytä litraksi.
	(Säilytys tummassa pullossa)	Natriumasetaatti	80g	
		Etikkahappo 100% (1ml laim. 50ml:ksi)		
	Kaliumjodaattuliuos	Kaliumjodaatti, KIO <sub>3</sub>	2g	Liuota kaliumjodaatti veteen, täytä litraksi.
		Tislattu vesi	1000ml:ksi	

## Liite 2. Lineaarisuus

DV		KA
st1		
1	201,98	
2	206,4	203,76
3	202,9	
st2		
1	393,77	
2	407,47	403,36
3	408,83	
st3		
1	606,56	
2	596,34	601,76
3	602,38	
st4		
1	797,21	
2	781,15	792,03
3	797,74	

FAN		KA
1	79,90	
2	79,90	79,85
3	79,76	
1	160,30	
2	159,98	159,91
3	159,44	
1	239,71	
2	239,63	239,48
3	239,11	
1	320,09	
2	320,55	319,68
3	318,39	

## Liite 3. Lineaarinen regressio

1 (2)

DV

<i>Regressiotunnusluvut</i>	
Kerroin R	0,999937312
Korrelaatiokerroin	0,999874628
Tarkistettu korrelaatio	0,999811942
Keskivirhe	3,475879026
Havainnot	4

ANOVA									
	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>				
Regressio	1	192709,7	192709,6752	15950	6,2688E-05				
Jäännös	2	24,16347	12,081735						
Yhteensä	3	192733,8							
	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t</i>	<i>Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>	<i>Alin 95%</i>	<i>Ylin 95%</i>	<i>Alin 95,0%</i>	<i>Ylin 95,0%</i>
Leikkauspiste	9,425	4,257065	2,21396666	0,157	-8,8916724	27,7417	-8,891672	27,74167	
Muuttuja X 1	0,981605	0,007772	126,2952762	6E-05	0,94816348	1,01505	0,948163	1,015047	

JÄÄNNÖSTULOSTUS		
<i>Havainto</i>	<i>Ennustettu Y</i>	<i>Jäännökset</i>
1	205,746	-1,986
2	402,067	1,293
3	598,388	3,372
4	794,709	-2,679

FAN

<i>Regressiotunnusluvut</i>	
Kerroin R	0,999998941
Korrelaatiokerroin	0,999997882
Tarkistettu korrelaatiokerroin	0,999996823
Keskivirhe	0,183874958
Havainnot	4

2 (2)

ANOVA									
	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>				
Regressio	1	31924,844	31924,84418	944243	1,059E-06				
Jäännös	2	0,06762	0,03381						
Yhteensä	3	31924,912							
	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t</i>	<i>Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>	<i>Alin 95%</i>	<i>Ylin 95%</i>	<i>Alin 95,0%</i>	<i>Ylin 95,0%</i>
Leikkauspiste	-0,035	0,2251999	-0,15541747	0,8908	-1,003957	0,934	-1,00396	0,93396	
Muuttuja X 1	0,998825	0,0010279	971,7214907	1E-06	0,99440234	1,0032	0,994402	1,00325	

JÄÄNNÖSTULOSTUS		
<i>Havainto</i>	<i>Ennustettu Y</i>	<i>Jäännökset</i>
1	79,871	-0,021
2	159,777	0,133
3	239,683	-0,203
4	319,589	0,091

## Liite 4. Systemin toistettavuus

DV	st18
	289
	294
	290
	287
	303
	308
	309
	308
	294
	320
	319
	319
KA	303,3333
STD	12,31653
CV	0,040604

FAN	st18
	149
	153
	153
	148
	151
	150
	147
	156
	154
	154
	150
	149
KA	151,1667
STD	2,790677
CV	0,018461

## Liite 5. Tarkkuus

<b>DV</b>		todellinen pitoisuus	lisäys	<b>SAANTO%</b>	
	tulos	$x = (y - 9.425)/0.9816$			
m21252+0	329,18	325,7488	0		
m21252+100	433,51	432,0344	100	<b>106</b>	
m21252+200	542,93	543,5055	200	<b>109</b>	
m21252+300	638,33	640,6938	300	<b>105</b>	
				107	%

<b>FAN</b>		tod.pitoisuus			
	tulos	$x = (y + 0.035)/0.9988$	lisäys	<b>SAANTO%</b>	
1025361 vv	184,48	184,7380	0		
-361vv+50	240,02	240,3468	50	<b>111</b>	
-361vv+75	264,65	265,0072	75	<b>107</b>	
-361vv+100	290,87	291,2583	100	<b>107</b>	
				108	%

## Liite 6. Menetelmän toistettavuus

<b>DV</b>		tod. pitoisuus			
näyte	tulos	$x = (y - 9.425) / 0.9816$	KA	STD	CV
1024640	299,42	295,4309291			
1024640	305,16	301,2785249			
1024640	302,21	298,2732274	295,80447	3,49138	0,011803
1024640	298,96	294,9623064			
1024640	297,31	293,2813773			
1024640	295,66	291,6004482			

<b>FAN</b>		tod. pitoisuus			
näyte	tulos	$x = (y + 0.035) / 0.9988$	KA	STD	CV
1024801	186,84	187,0995194			
1024801	184,70	184,9569483			
1024801	186,75	187,0094113	186,5522	0,90887	0,004872
1024801	186,78	187,0394473			
1024801	186,99	187,2496996			
1024801	185,70	185,9581498			



## Liite 7. Toteamis- ja määritysrajat

1 (2)

